

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

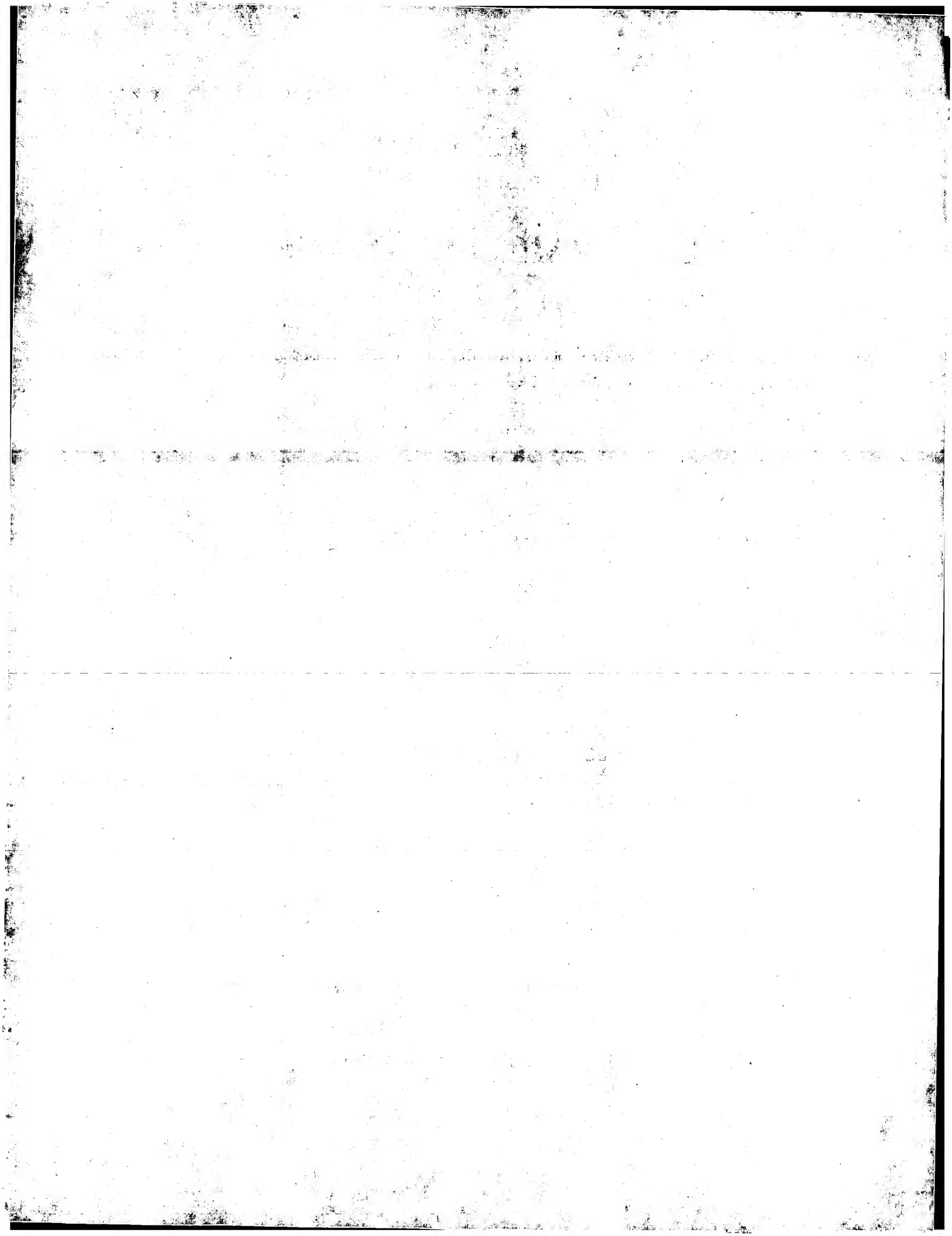
Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**





## 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類 <b>C12N 15/00, C12P 21/00</b>	<b>A1</b>	(11) 国際公開番号 <b>WO98/07840</b>  (43) 国際公開日 1998年2月26日(26.02.98)
(21) 国際出願番号 PCT/JP97/02859  (22) 国際出願日 1997年8月19日(19.08.97)  (30) 優先権データ 特願平8/235928                      1996年8月19日(19.08.96)                      JP  (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 雪印乳業株式会社 (SNOW BRAND MILK PRODUCTS CO., LTD.)[JP/JP] 〒065 北海道札幌市東区苗穂町6丁目1番1号 Hokkaido, (JP) (72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 中川信明(NAKAGAWA, Nobuaki)[JP/JP] 〒329-05 栃木県下都賀郡石橋町石橋578-15 西浦ハイツ2-4 Tochigi, (JP) 保田尚孝(YASUDA, Hisataka)[JP/JP] 〒329-04 栃木県河内郡南河内町緑2-3293-46 Tochigi, (JP) 森永伴法(MORINAGA, Tomonori)[JP/JP] 〒321-02 栃木県下都賀郡壬生町幸町3-11-12 Tochigi, (JP)		(74) 代理人 弁理士 藤野清也(FUJINO, Seiya) 〒160 東京都新宿区四谷1丁目2番1号 三浜ビル8階 Tokyo, (JP)  (81) 指定国    AU, CA, CN, FI, HU, IL, KR, MX, NO, NZ, RU, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).  添付公開書類 国際調査報告書
(54) Title: <b>NOVEL DNAS AND PROCESS FOR PRODUCING PROTEINS BY USING THE SAME</b>  (54) 発明の名称    新規DNA及びそれを用いた蛋白質の製造方法  (57) Abstract DNAs represented by Sequence Listings (1 and 2) and a process for producing proteins which comprises inserting these DNAs into expression vectors to thereby produce proteins having molecular weights of about 60 kD (under reductive conditions) and about 60 kD and about 120 kD (under nonreductive conditions) and being capable of inhibiting the formation of osteoclasts. These proteins are useful in the treatment of osteoporosis and rheumatism.		

配列表 1 及び 2 で示される DNA および該 DNA を発現ベクターに挿入し、遺伝子工学的手法によって分子量約 60kD (還元条件下) の約 60kD 及び約 120kD (非還元条件下) の破骨細胞形成抑制作用を有する蛋白質を製造する方法。

この蛋白質は、破骨細胞形成抑制作用を有し、骨粗鬆症、リウマチ症の治療に有用である。

PCT に基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に記載された PCT 加盟国を同定するために使用されるコード (参考情報)

AL	アルバニア	ES	スペイン	LK	スリランカ	SE	スウェーデン
AM	アルメニア	FI	フィンランド	LR	リベリア	SG	シンガポール
AT	オーストリア	FR	フランス	LS	レソト	SI	スロヴェニア
AU	オーストラリア	GB	英国	LT	リトアニア	SK	スロヴァキア共和国
AZ	アゼルバイジャン	GE	グルジア	LU	ルクセンブルグ	SL	シエラレオネ
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GH	ガーナ	LV	ラトヴィア	SN	セネガル
BB	バルバドス	GM	ガンビア	MC	モナコ	SZ	スワジランド
BE	ベルギー	GN	ギニア	MD	モルドヴァ共和国	TD	チャド
BF	ブルキナ・ファソ	GW	ギニアビサウ	MG	マダガスカル	TG	トーゴ
BG	ブルガリア	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国	TJ	タジキスタン
BJ	ベナン	HU	ハンガリー	ML	マリ	TM	トルクメニスタン
BR	ブラジル	ID	インドネシア	MN	モンゴル	TR	トルコ
BY	ベラルーシ	IE	アイルランド	MR	モーリタニア	TT	トリニダード・トバゴ
CA	カナダ	IL	イスラエル	MW	マラウイ	UG	ウガンダ
CF	中央アフリカ共和国	IS	アイスランド	MX	メキシコ	US	米国
CG	コンゴ	IT	イタリア	NE	ニジェール	UZ	ウズベキスタン
CH	スイス	JP	日本	NL	オランダ	VN	ヴェトナム
CI	コート・ジボアール	KE	ケニア	NO	ノルウェー	YU	ユーゴスラビア
CN	中国	KG	キルギスタン	NZ	ニュージーランド	ZW	ジンバブエ
CU	キューバ	KR	朝鮮民主主義人民共和国	PL	ポーランド		
CZ	チェコ共和国	KR	大韓民国	PT	ポルトガル		
DE	ドイツ	KZ	カザフスタン	RO	ルーマニア		
DK	デンマーク	LI	スイス	RU	ロシア連邦		
EE	エストニア			SD	スーダン		

## 明 細 書

## 新規DNA及びそれを用いた蛋白質の製造方法

技術分野

本発明は、新規なDNA、及びそれを用いて遺伝子工学的手法により破骨細胞の分化及び／又は成熟抑制活性（以下、破骨細胞形成抑制活性という）を有する蛋白質を製造する方法に関する。詳しくは、破骨細胞形成抑制活性を有する蛋白質OCIFをコードするゲノムDNA、及びこのゲノムDNAを用いて遺伝子工学的手法により該蛋白質を製造する方法に関する。

発明の背景

人の骨は絶えず吸収と再形成を繰り返しているが、この過程で中心的な働きをしている細胞が、骨形成を担当する骨芽細胞と骨吸収を担当する破骨細胞である。これらの細胞が担当している骨代謝の異常により発生する疾患の代表として骨粗鬆症が挙げられる。この疾患は骨芽細胞による骨形成を破骨細胞による骨吸収が上回ることにより発生する疾患である。この疾患の発生メカニズムについては未だ完全には解明されていないが、この疾患は骨の疼痛を発生し、骨の脆弱化による骨折の原因となる疾患である。高齢人口の増加に伴い、骨折による寝たきり老人の発生の原因となるこの疾患は社会問題にもなっており、その治療薬の開発が急務となっている。このような骨代謝異常による骨量減少症は骨吸収の抑制、骨形成の促進、或いはこれらのバランスの改善により治療することが期待される。

骨形成は、骨形成を担当する細胞の増殖、分化、活性化を促進すること、或いは骨吸収を担当する細胞の増殖、分化、活性化を抑制することにより促進することが期待される。近年、このような活性を有する生理活性蛋白質（サイトカイン）への関心が高まり、精力的な研究が行われている。骨芽細胞の増殖或いは分化を

促進するサイトカインとして、線維芽細胞増殖因子ファミリー(fibroblast growth factor ; FGF : Rodan S.B. et al., Endocrinology vol. 121, p1917, 1987)、インシュリン様増殖因子-I(insulin like growth factor-I ; IGF-I : Hock J. M. et al., Endocrinology vol. 122, p254, 1988)、インシュリン様増殖因子-II (IGF-II: McCarthy T. et al., Endocrinology vol.124, p301, 1989)、アクチビンA(Activin A ; Centrella M. et al., Mol. Cell. Biol. vol. 11, p250, 1991)、トランスフォーミング増殖因子- $\beta$ (transforming growth factor- $\beta$  ; Noda M., The Bone, vol. 2, p29, 1988)、バスキュロトロピン(Vasculotropin ; Varonique M. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. vol. 199, p380, 1994)、及び異所骨形成因子ファミリー(bone morphogenic protein ; BMP : BMP-2 ; Yamaguchi, A et al., J. Cell Biol. vol. 113, p682, 1991, OP-1 ; Sampath T. K. et al., J. Biol. Chem. vol. 267, p20532, 1992, Knutson R. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. vol.194, p1352, 1993)等のサイトカインが報告されている。

一方、破骨細胞形成、即ち破骨細胞形成の分化及び／又は成熟を抑制するサイトカインとしては、トランスフォーミング増殖因子- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$  ; Chenu C. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol.85, p5683, 1988)やインターロイキン-4(interleukin-4 ; Kasano K. et al., Bone-Miner., vol. 21, p179, 1993)等が報告されている。又、破骨細胞による骨吸収を抑制するサイトカインとしては、カルシトニン(calcitonin ; Bone-Miner., vol.17, p347, 1992)、マクロファージコロニー刺激因子(macrophage colony-stimulating factor; Hattersley G. et al. J. Cell. Physiol. vol.137, p199, 1988)、インターロイキン-4(Watanabe, K. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. vol. 172, p1035, 1990)、及びインターフェロン- $\gamma$ (interferon- $\gamma$  ; Gowen M. et al., J. Bone Miner. Res., vol. 1, p469, 1986)等が報告されている。

これらのサイトカインは、骨形成の促進や骨吸収の抑制による骨量減少症の改善剤となることが期待され、インシュリン様増殖因子-I や異所骨形成因子ファミリーのサイトカイン等、上記のサイトカインの一部については骨代謝改善剤として臨床試験が実施されている。又、カルシトニンは、骨粗鬆症の治療薬、疼痛軽減薬として既に市販されている。又、現在、骨に関わる疾患の治療及び治療期間の短縮を図る医薬品として、臨床では活性型ビタミンD<sub>3</sub>、カルシトニン及びその誘導体、エストラジオール等のホルモン製剤、イブリフラボン又はカルシウム製剤等が使用されている。しかし、これらを用いた治療法はその効果並びに治療結果において必ずしも満足できるものではなく、これらに代わる新しい治療薬の開発が望まれていた。

本発明者らは、このような状況に鑑み鋭意探索の結果、既にヒト胎児肺線維芽細胞 IMR-90 (ATCC寄託-受託番号 CCL186)の培養液に破骨細胞形成抑制活性、即ち破骨細胞形成抑制活性を有する蛋白質OCIFを見出している (PCT/JP96/00374号)。この破骨細胞形成抑制活性を有する蛋白質OCIFの由来について、さらに鋭意探索したところ、ヒト由来OCIFのゲノムDNAの塩基配列を決定するに至った。即ち、本発明は破骨細胞形成抑制活性を有する蛋白質OCIFをコードするゲノムDNA、及びそれを用いて遺伝子工学的手法により該蛋白質を製造する方法を提供することを課題とする。

### 発明の開示

本発明は、破骨細胞形成抑制活性を有する蛋白質OCIFをコードするゲノムDNA、及びそれを用いて遺伝子工学的手法により該蛋白質を製造する方法に関する。本発明のDNAは、配列表配列番号1及び2の塩基配列を含む。

また、本発明は、配列表配列番号1及び2の塩基配列を含むDNAを発現ベクターに挿入して次の物理化学的性質をもち、破骨細胞の分化及び／又は成熟抑制活性のある蛋白質を発現することのできるベクターを作成し、これを用いて遺伝

子工学的手法により該蛋白質を製造する方法に関する。

(a) 分子量(SDS-PAGE による) ;

(i) 還元条件下で約60kD

(ii) 非還元条件下で約60kD及び約120kD

(b) アミノ酸配列;

配列表配列番号3のアミノ酸配列を有する。

(c) 親和性 ;

陽イオン交換体及びヘパリンに親和性を有する。

(d) 熱安定性 ;

(i) 70℃、10分間または56℃、30分間の加熱処理により破骨細胞の分化・成熟抑制活性が低下する。

(ii) 90℃、10分間の加熱処理により破骨細胞の分化・成熟抑制活性が失われる。

本発明の遺伝子を発現させることにより得られる蛋白質は、破骨細胞形成抑制活性を有し、骨粗鬆症などの骨量減少症、リウマチ又は変形性関節症などの骨代謝異常疾患、あるいは多発性骨髄腫瘍などの骨代謝異常疾患の治療及び改善を目的とした医薬組成物として、あるいはこのような疾患の免疫学的診断を確立するための抗原として有用である。

#### 図面の簡単な説明

第1図は、実施例4(iii)における、本発明ゲノムDNAを発現して得られた蛋白質の、ウエスタンブロッティングの結果を示す。ここで 1はマーカー、2はベクターpWESR  $\alpha$ OCIFをトランスフェクトした COS7 細胞培養上清(実施例4(iii))、3はベクターpWESR  $\alpha$ をトランスフェクトした COS7 細胞培養上清(対照)である。



### 発明を実施するための最良の形態

本発明の破骨細胞形成抑制活性を有する蛋白質OCIFをコードするゲノムDNAは、ヒト胎盤ゲノムDNAとコスミドベクターを用いてコスミドライブラリーを作製し、このライブラリーをOCIF cDNAをもとに作製したDNA断片をプローブとしてスクリーニングすることにより得られる。このようにして得られたゲノムDNAを適当な発現ベクターに挿入してOCIF発現コスミドを作製し、常法により各種の細胞及び菌株などの宿主にトランスフェクトして発現させることにより、組み換え型OCIFを製造することができる。得られた破骨細胞形成抑制活性を有する蛋白質（破骨細胞形成抑制因子）は、骨粗鬆症等の骨量減少症或いはその他の骨代謝異常疾患の治療及び改善を目的とした医薬組成物として、或いはこのような疾患の免疫学的診断を確立するための抗原として有用である。本発明の蛋白質は、製剤化して経口或いは非経口的に投与することができる。即ち、本発明の蛋白質を含む製剤は、破骨細胞形成抑制因子を有効活性成分として含む医薬組成物としてヒト及び動物に対して安全に投与されるものである。医薬組成物の形態としては、注射用組成物、点滴用組成物、坐剤、経鼻剤、舌下剤、経皮吸収剤等が挙げられる。注射用組成物の場合は、本発明の破骨細胞形成抑制因子の薬理的有効量及び製薬学的に許容しうる担体の混合物であり、その中にはアミノ酸、糖類、セルロース誘導体、及びその他の有機／無機化合物等の一般的に注射用組成物に添加される賦形剤／賦活剤を用いることもできる。又、本発明の破骨細胞形成抑制因子とこれらの賦形剤／賦活剤を用い注射剤を調製する場合は、必要に応じてpH調整剤、緩衝剤、安定化剤、可溶化剤等を添加して常法によって各種注射剤とすることができる。

以下に実施例を挙げて本発明をより詳細に説明するが、これらは単に例示するのみであり、本発明はこれらにより限定されるものではない。

#### 実施例 1

##### コスミドライブラリーの作製

ヒト胎盤ゲノムDNA(クローンテック社 ; Cat.No. 6550-2)とpWE15 コスミドベクター (ストラタジーン社) を用いてコスミドライブラリーを作製した。基本的には、ストラタジーン社のpWE15 コスミドベクターキットに添付されたプロトコールに従って実施したが、DNA、大腸菌、ファージを扱う一般的方法は、Molecular Cloning : A Laboratory Manual(Cold Spring Harbor Laboratory(1989))を参考に従った。

(i) ヒト・ゲノムDNA 制限酵素分解物の調製

1.5ml のエッペンドルフチューブ4本 (チューブA、B、C、D)に10mM Tris-HCl、10mM MgCl<sub>2</sub>、100mM NaClを含む溶液 750 $\mu$ l に溶かしたヒト胎盤ゲノムDNAをそれぞれ 100 $\mu$ g入れ、チューブA には 0.2ユニット、チューブB には0.4 ユニット、チューブC には 0.6ユニット、チューブD には 0.8ユニットの制限酵素MboIを添加して1時間消化した。その後、それぞれのチューブに20mMになるようにEDTAを添加して反応を止め、フェノール/クロロホルム (1 : 1) で抽出し、水相に2倍量のエタノールを加えてDNAを沈殿させた。遠心分離でDNAを回収したあと、70%エタノールで洗い、それぞれのチューブの中のDNAを100 $\mu$ lのTEに溶解した。4本のチューブのDNAを1本にまとめ、68 $^{\circ}$ Cにて10分保温したのち室温に戻し、これを遠心管 (38 ml)の中で作製した10%-40%直線状ショ糖密度勾配に重層した。ショ糖密度勾配は20mM Tris-HCl(pH8.0)、5mM EDTA、1M NaClを含む緩衝液のなかで作製した。この遠心管を日立製作所SRP28SAローターを用いて20 $^{\circ}$ Cで26,000rpmにて24時間遠心したのち、フラクションコレクターを用いてショ糖密度勾配を0.4ml ずつのフラクションに分画した。各フラクションの一部を0.4 %アガロース電気泳動にかけてDNAのサイズを確認したのち、およそ30kb (キロベースペア) から40kbの長さのDNAを含むフラクションを集め、糖濃度を10%以下になるようTEで希釈したのちエタノールを2.5倍量加えてDNAを沈殿させた。DNAはTE (10mM HCl(pH8.0)+1mM EDTA緩衝液 (以下TEという)) に溶解したのち4 $^{\circ}$ Cで保存した。

### (ii) コスミド・ベクターの準備

ストラタジーン社の pWE15 コスミドベクターをコスミドベクターキットに添付されたプロトコールに従って制限酵素 BamHI によって完全消化したのち、エタノール沈殿によって DNA を回収し、1mg/ml の濃度になるよう TE に溶解した。この DNA の 5' 末端のリン酸を子牛小腸アルカリ性フォスファターゼを用いて除いた後、フェノール抽出とエタノール沈殿によって DNA を回収し、1mg/ml の濃度になるよう TE に溶解した。

### (iii) ゲノム DNA のベクターへのライゲーション及び in vitro パッケージング

1.5  $\mu$ g のサイズ分画したゲノム DNA と 3  $\mu$ g の制限酵素 BamHI で消化した pWE15 コスミドベクターをファルマシア社の Ready-To-Go T4DNA ライゲースを用いて 20  $\mu$ l の反応溶液中でライゲーションした。ライゲーションした DNA を、ギガパック II パッケージングエクストラクト（ストラタジーン社）を用い、プロトコールに従って in vitro パッケージングした。パッケージング反応後、反応液の一部を SM 緩衝液で段階的に希釈し、10mM MgCl<sub>2</sub> に懸濁した大腸菌 XL1-Blue MR（ストラタジーン社）と混合してファージを感染させたのち、50  $\mu$ g/ml のアンピシリンを含む LB アガープレートに蒔き、生ずるコロニーの数を計数した。この結果を基にパッケージング反応液 1  $\mu$ l 当たりのコロニー数を算出した。

### (iv) コスミドライブラリーの作製

上記の方法で作製したパッケージング反応液と大腸菌 XL1-Blue MR を混合し、直径 15cm のアガロースプレート当たり 50,000 個のコロニーが生ずるようにアンピシリンを含むアガロースプレートに蒔いた。一夜 37°C でプレートを保温したのち、プレート一枚当たり 3ml の LB 培地を加えて大腸菌のコロニーを懸濁し、回収した。アガロースプレートをさらに 3ml の LB 培地で 1 回洗い、これを基の大腸菌懸濁液と合わせた。すべてのアガロースプレートから回収した大腸菌を一本の遠心管にまとめ、グリセロールを 20% となるように添加し、さらにアンピシリンを 50  $\mu$ g/ml となるように加えた。十分混合したのち一部を分取し、残りを -80°C に保

存した。分取した大腸菌を段階希釈してアガープレートに蒔き、1ml 当たりのコロニー数を算出した。

## 実施例 2

### コスミドライブラリーのスクリーニングとコロニーの純化

50  $\mu$ g/ml のアンピシリンを含む直径15cmのLBアガロースプレートに直径14.2cmのニトロセルロースフィルター（ミリポア社）を乗せ、その上にプレート一枚当たり50,000個の大腸菌コロニーが生ずるようにコスミドライブラリーを蒔き、37℃にて一夜保温した。常法に従ってニトロセルロースフィルター上の大腸菌を別のニトロセルロースフィルターに転写してレプリカフィルターを2枚作製した。コスミドベクターキットに添付されたプロトコールに従い、レプリカフィルター上の大腸菌をアルカリ変成、中和し、ストラタリンカー（ストラタジーン社）を用いてDNA をニトロセルロースフィルター上に固定した。さらにこのフィルターを減圧オープン中で80℃で2 時間加熱した。このように処理したニトロセルロースフィルターを、ヒトOCIFcDNAの5' 末端と3' 末端から作製した2種のDNA をプローブとしてハイブリダイズした。即ち、OCIFcDNAを含む大腸菌 pBK/OIF10（通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所寄託、受託番号FERM BP-5267）よりプラスミドを精製し、OCIFcDNAを含むプラスミドを制限酵素KpnIとEcoRI で消化し、生ずるフラグメントをアガロースゲルを用いて分離したのち、0.2kb のKpnI/EcoRIフラグメントをQIAEX IIゲルエクストラクションキット（キアゲン社）を用いて精製した。このDNA をメガプライムDNA ラベリングシステム（アマシャム社製）を用いて<sup>32</sup>P で標識した（5'-DNAプローブ）。また別に、得られたプラスミドを制限酵素 BamHIと制限酵素 EcoRVで消化して生ずる0.2kb のBamHI/EcoRV フラグメントを同様に精製し、上記の方法で<sup>32</sup>P 標識した（3'-DNAプローブ）。上記レプリカフィルターのうち一枚を5'-DNAプローブと、別の一枚を3'-DNAプローブとハイブリダイズした。コロニーハイブリダイゼーション及びフィルターの洗浄はコスミドベクターキットに添付されたプロトコールに述べられた方法に従っ

て行った。オートラジオグラフィーの結果それぞれのプローブで複数個の陽性シグナルが検出されたが、両方のプローブにハイブリダイズする陽性シグナルが一個検出された。このシグナルに相当するアガロースプレート上のコロニーを精製することにより純化したコロニーを単離した。純化されたコロニーから常法に従ってコスミドを精製しpWEOCIF と命名した。このコスミドに含まれるヒトゲノムDNA のサイズはおよそ38kbであった。

### 実施例 3

#### ヒトOCIFゲノムDNA の塩基配列の決定

##### (i) OCIF ゲノムDNA のサブクローニング

コスミドpWEOCIFを制限酵素EcoRIを用いて消化し、生じたフラグメントを 0.7 %アガロースゲルに供与して分離したのち、サザンブロット法によってDNA をナイロン膜 (Hybond-N、アマシャム社) に移し、ストラタリンカー (ストラタジーン社) を用いてDNA をナイロン膜に固定した。一方、プラスミドpBKOCIF を制限酵素EcoRI によって消化し、ヒトOCIFcDNAを含む1.6kb のフラグメントをアガロースゲルを用いて単離したのち、メガプライムDNA ラベリングシステム (アマシャム社) を用いて $^{32}\text{P}$  標識した。常法に従って上記ナイロン膜と $^{32}\text{P}$  標識した1.6kb のOCIFcDNAをハイブリダイズさせた結果、6kb 、4kb 、3.6kb 、2.6kbのDNAフラグメントがハイブリダイズすることがわかった。ヒトOCIFcDNAとハイブリダイズするこれらのフラグメントをアガロースゲルを用いて単離したのち、それぞれpBluescript II SK+ベクター (ストラタジーン社) のEcoRI サイトに常法に従ってサブクローニングし、得られたプラスミドをそれぞれpBSE6 、pBSE4 、pBSE3.6 、pBSE2.6 と命名した。

##### (ii) 塩基配列の決定

上記プラスミドにサブクローニングされたヒトOCIFゲノムDNA の塩基配列の決定にはABI ダイデオキシターミネーターサイクルシーケンシングレディーリアクションキット (パーキンエルマー社) と373 シーケンシングシステム (アプ

ライドバイオシステムズ社)を使用した。塩基配列決定用プライマーはヒトOCIF cDNAの塩基配列(配列表配列番号4)をもとに合成した。また、塩基配列が決定された部分をもとにしてさらにプライマーを合成した。決定された塩基配列を配列表配列番号1及び2に示す。配列番号1にはOCIF遺伝子の第1エクソンが含まれ、配列番号2には第2、第3、第4、第5エクソンが含まれる。第1エクソンと第2エクソンの間にはおよそ17kbのヌクレオチドが介在する。

#### 実施例4

##### COS-7細胞による組み換え型OCIFの生産

##### (i) OCIFゲノムDNA発現コスミドの作製

OCIFゲノムDNAを動物細胞で発現させるために、コスミドベクターpWE15(ストラタジーン社)に発現プラスミドpcDL-SR  $\alpha$ 296(Molecular and Cellular Biology, vol. 8, p466-472, 1988)の発現ユニットを挿入した。まず、発現プラスミドpcDL-SR  $\alpha$ 296を制限酵素SalIで消化してSR $\alpha$ プロモーター、SV40後期スプライス信号、ポリ(A)付加信号などを含む約1.7kbの発現ユニットを切り出し、アガロース電気泳動によって分離後、QIAEX IIゲルエクストラクションキット(キアゲン社)を用いて精製した。一方、コスミドベクターpWE15を制限酵素EcoRIで消化し、アガロース電気泳動によって分離後、8.2kbのpWE15 DNAをQIAEX IIゲルエクストラクションキット(キアゲン社)を用いて精製した。これら二つのDNA断片末端をDNAブランディングキット(宝酒造社)を用いて平滑化し、DNAライゲーションキット(宝酒造社)を用いて結合させ、大腸菌DH5 $\alpha$ (ギブコBRL社)に導入した。得られた形質転換株を増殖させ、発現ユニットを含む発現コスミドpWESR  $\alpha$ をキアゲンカラム(キアゲン社)を用いて精製した。

前記(i)で得られた約38kbのOCIFゲノムDNAが挿入されたコスミドpWEOCIFを制限酵素NotIで消化して約38kbのOCIFゲノムDNAを切り出し、アガロース電気泳動によって分離後、QIAEX IIゲルエクストラクションキット(キアゲン社)を用いて精製した。一方、発現コスミドpWESR  $\alpha$ を制限酵素EcoRIで消化し、フ

ェノール、クロロホルムで抽出した後、エタノール沈殿し、TEに溶解した。この制限酵素EcoRI で消化されたpWESR  $\alpha$ とEcoRI-XmnI-NotI アダプター(#1105、#1156 ; ニューイングランドバイオラボ社)をT4 DNAリガーゼ(宝酒造社)を用いて結合し、アガロース電気泳動によってフリーのアダプターと分離後、QIAEX II ゲルエクストラクションキット(キアゲン社)を用いて精製した。制限酵素NotI で消化された約37kbのOCIFゲノムDNAとアダプターを付加したpWESR  $\alpha$ をT4 DNAリガーゼ(宝酒造社)を用いて結合し、ギガパックIIパッケージングエクストラクト(ストラータジーン社)を用いてインヴィトロパッケージングを行い、大腸菌XL1-Blue MR (ストラータジーン社)に感染させた。得られた形質転換株を増殖させ、OCIFゲノムDNAが挿入された発現コスミドpWESR  $\alpha$ OCIFをキアゲンカラム(キアゲン社)を用いて精製した。OCIF発現コスミドpWESR  $\alpha$ OCIFをエタノールによって沈殿させた後、無菌蒸留水に溶解し以下の操作に用いた。

#### (ii)OCIFゲノムDNAのトランジェントな発現及びOCIF活性の測定

前記(i) で得られたOCIF発現コスミドpWESR  $\alpha$ OCIFを用いて、以下に述べる方法で組み換え型OCIFを発現させ、その活性を測定した。 $8 \times 10^5$  個のCOS-7 細胞(理化学研究所細胞開発銀行、RCB0539)を6 ウェルプレートの各ウェルに10%牛胎児血清(ギブコBRL社)を含むDMEM培地(ギブコBRL社)を用いて植え込み、翌日、培地を除いた後、無血清DMEM培地で細胞を洗浄した。トランスフェクション用試薬リポフェクタミン(ギブコBRL社)添付のプロトコールに従い、あらかじめOPTI-MEM培地(ギブコBRL社)を用いて希釈しておいたOCIF発現コスミドpWESR  $\alpha$ OCIFとリポフェクタミンを混合した後、この混合液を各ウェルの細胞に加えた。対照として発現コスミドpWESR  $\alpha$ を用い、細胞に同様に加えた。用いたコスミドDNA及びリポフェクタミンの量はそれぞれ3  $\mu$ g 及び12  $\mu$ l であった。24時間後、培地を除き1.5ml の新しいEX-CELL301培地(JRH バイオサイエンス社)を加え、さらに48時間後、培地を回収し、これをOCIF活性測定用サンプルとした。OCIFの活性測定は久米川正好らの方法(蛋白質・核酸・

酵素 Vol. 34, p999 (1989)) 及びTakahashi N. et.alの方法(Endocrinology vol. 122, p1373 (1988)) に従い測定した。生後約17日のマウス骨髄細胞からの活性型ビタミンD<sub>3</sub>存在下での破骨細胞形成を酒石酸耐性酸性ホスファターゼ活性の誘導で試験し、その抑制活性を測定し、破骨細胞形成抑制活性を有する蛋白質(OCIF)の活性とした。すなわち、96ウェルマイクロプレートの各ウェルに、 $2 \times 10^{-8}$  Mの活性型ビタミンD<sub>3</sub>と10%牛胎児血清を含む $\alpha$ -MEM培地(ギブコBRL社)で希釈したサンプル 100  $\mu$ l を入れ、生後約17日のマウス骨髄細胞  $3 \times 10^5$  個を 100  $\mu$ l の10%牛胎児血清を含む $\alpha$ -MEM培地に懸濁させて播種し、5% CO<sub>2</sub>、37°C、湿度 100%にて一週間培養した。培養3日目と5日目に、培養液のうち 160  $\mu$ l を廃棄し、 $1 \times 10^{-8}$  M活性型ビタミンD<sub>3</sub>及び10%牛胎児血清を含む $\alpha$ -MEM培地で希釈したサンプル 160  $\mu$ l を添加した。培養7日後に細胞をリン酸塩緩衝生理食塩水で洗浄した後エタノール/アセトン(1:1)溶液で細胞を室温にて1分間固定し、破骨細胞形成を酸性ホスファターゼ活性測定キット(Acid Phosphatase, Leucocyte, Cat.No.387-A; シグマ社)を用いた染色で検出した。酒石酸存在下での酸性ホスファターゼ活性陽性細胞の減少をOCIF活性とした。結果を表1に示す。この結果より、IMR-90の培養液から得られた天然型OCIF及びCHO細胞で生産した組み換え型OCIFと同様の活性を、この培養液が有することが確認された。

表 1

COS-7細胞で発現させた培養液中のOCIF活性

希釈率	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320
OCIF genomic DNA導入	++	++	++	++	+	-
ベクター導入	-	-	-	-	-	-
未処理	-	-	-	-	-	-



〔表中、++は破骨細胞形成が80%以上抑制される活性を、+は破骨細胞形成が30～80%抑制される活性を、-は活性が検出されないことを示す。〕

### (iii)ウエスタンブロッティングによる生産物の確認

上記(ii)で得られたOCIF活性測定用サンプルを10 $\mu$ l 取り、10 $\mu$ l のSDS-PAGE用サンプルバッファー(0.5M Tris-HCl、20% グリセロール、4% SDS、20 $\mu$ g/mlブロムフェノールブルー、pH 6.8)を加えて100℃で3分間煮沸したのち、非還元状態で10%SDS ポリアクリルアミド電気泳動を行った。電気泳動後、セミドライブロッティング装置(バイオラッド社)を用いて蛋白質をゲルからPVDFメンブレン(ProBlott、パーキンエルマー社)にブロッティングした。そのメンブレンをブロッキング後、先に得られたOCIF蛋白質を西洋ワサビパーオキシダーゼで常法により標識した西洋ワサビパーオキシダーゼ標識抗OCIF抗体とともに37℃で2時間保温した。洗浄後、ECL システム(アマシャム社)を用いて抗OCIF抗体が結合している蛋白質を検出した。第1図に示すようにpWESR  $\alpha$ OCIFをトランスフェクトしたCOS-7細胞の培養上清からは、分子量約120キロダルトンと60キロダルトンの2本のバンドが検出された。一方、pWESR  $\alpha$ ベクターのみをトランスフェクトしたCOS-7細胞の培養上清を同様の方法で解析した結果、120キロダルトンと60キロダルトンのバンドは検出されなかった。この結果より、得られた蛋白質はOCIFであることが確認された。

### 産業上の利用の可能性

本発明によると破骨細胞形成抑制活性を有する蛋白質OCIFをコードするゲノムDNA、及びそれを用いて遺伝子工学的手法により該蛋白質を製造する方法が提供される。本発明の遺伝子を発現させることにより得られる蛋白質は、破骨細胞形成抑制活性を有し、骨粗鬆症などの骨量減少症、リウマチ又は変形性関節症などの骨代謝異常疾患、あるいは多発性骨髄腫瘍などの骨代謝異常疾患の治療及び

改善を目的とした医薬組成物として、あるいはこのような疾患の免疫学的診断を確立するための抗原として有用である。

微生物への言及

寄託機関：通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所

住 所：日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号

寄託日：平成7年6月21日

(平成7年6月21日に原寄託され、平成7年10月25日にブダ  
ペスト条約に基づく国際寄託へ移管)

受託番号：FERM BP-5267

1 5

## 配列表

配列番号 : 1

配列の長さ : 1 3 1 6

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 2

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : genomic DNA (ヒトOCIFゲノムDNA-1)

配列 :

CTGGAGACAT ATAACCTGAA CACTTGGCCC TGATGGGGAA GCAGCTCTGC AGGGACTTTT	60
TCAGCCATCT GTAAACAATT TCAGTGCCAA CCCGCGAACT GTAATCCATG AATGGGACCA	120
CACTTTACAA GTCATCAAGT CTAACCTCTA GACCAGGGAA TTAATGGGGG AGACAGCGAA	180
CCCTAGAGCA AAGTGCCAAA CTTCTGTCTG TAGCTTGAGG CTAGTGGAAG GACCTCGAGG	240
AGGCTACTCC AGAAGTTCAG CGCGTAGGAA GCTCCGATAC CAATAGCCCT TTGATGATGG	300
TGGGGTTGGT GAAGGGAACA GTGCTCCGCA AGGTTATCCC TGCCCCAGGC AGTCCAATTT	360
TCACCTCTGCA GATTCTCTCT GGCTCTAACT ACCCCAGATA ACAAGGAGTG AATGCAGAAT	420
AGCACGGGCT TTAGGGCCAA TCAGACATTA GTTAGAAAAA TTCCTACTAC ATGGTTTATG	480
TAAACCTGAA GATGAATGAT TGCGAACTCC CCGAAAAGGG CTCAGACAAT GCCATGCATA	540
AAGAGGGGGC CTGTAATTTG AGGTTTCAGA ACCCGAAGTG AAGGGGTCAG GCAGCCGGGT	600
ACGGCGGAAA CTCACAGCTT TCGCCCAGCG AGAGGACAAA GGTCTGGGAC AACTCCAAC	660
TGCGTCCGGA TCTTGGCTGG ATCGGACTCT CAGGGTGGAG GAGACACAAG CACAGCAGCT	720
GCCCAGCGTG TGCCCAGCCC TCCCACCGCT GGTCCCGGCT GCCAGGAGGC TGGCCGCTGG	780
CGGGAAGGGG CCGGGAACC TCAGAGCCCC GCGGAGACAG CAGCCGCCTT GTTCCTCAGC	840
CCGGTGGCTT TTTTTTCCCC TGCTCTCCA GGGGACAGAC ACCACCGCCC CACCCCTCAC	900
GCCCCACCTC CCTGGGGGAT CCTTTCCGCC CCAGCCCTGA AAGCGTTAAT CCTGGAGCTT	960
TCTGCACACC CCCCAGCCGC TCCCGCCCAA GCTTCCTAAA AAAGAAAGGT GCAAAGTTTG	1020
GTCCAGGATA GAAAAATGAC TGATCAAAGG CAGGCGATAC TTCCTGTTGC CGGGACGCTA	1080
TATATAACGT GATGAGCGCA CGGGCTGCGG AGACGCACCG GAGCGCTCGC CCAGCCGCCC	1140

1 6

CCTCCAAGCC CCTGAGGTTT CCGGGGACCA CA ATG AAC AAG TTG CTG TGC TGC 1193

Met Asn Lys Leu Leu Cys Cys

-20

-15

GCG CTC GTG GTAAGTCCCT GGGCCAGCCG ACGGGTGCCC GCGCCTGGG 1242

Ala Leu Val

GAGGCTGCTG CCACCTGGTC TCCCAACCTC CCAGCGGACC GCGGGGAGA AGGCTCCACT 1302

CGCTCCCTCC CAGG 1316

配列番号 : 2

配列の長さ : 9 8 9 8

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 2

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : genomic DNA (ヒトOCIFゲノムDNA - 2)

配列 :

GCTTACTTTG TGCCAAATCT CATTAGGCTT AAGGTAATAC AGGACTTTGA GTCAAATGAT 60

ACTGTTGCAC ATAAGAACAA ACCTATTTTC ATGCTAAGAT GATGCCACTG TGTTCTTTTC 120

TCCTTCTAG TTT CTG GAC ATC TCC ATT AAG TGG ACC ACC CAG GAA ACG TTT 171

Phe Leu Asp Ile Ser Ile Lys Trp Thr Thr Gln Glu Thr Phe

-10

-5

1

CCT CCA AAG TAC CTT CAT TAT GAC GAA GAA ACC TCT CAT CAG CTG TTG 219

Pro Pro Lys Tyr Leu His Tyr Asp Glu Glu Thr Ser His Gln Leu Leu

5

10

15

TGT GAC AAA TGT CCT CCT GGT ACC TAC CTA AAA CAA CAC TGT ACA GCA 267  
 Cys Asp Lys Cys Pro Pro Gly Thr Tyr Leu Lys Gln His Cys Thr Ala  
 20 25 30 35

AAG TGG AAG ACC GTG TGC GCC CCT TGC CCT GAC CAC TAC TAC ACA GAC 315  
 Lys Trp Lys Thr Val Cys Ala Pro Cys Pro Asp His Tyr Tyr Thr Asp  
 40 45 50

AGC TGG CAC ACC AGT GAC GAG TGT CTA TAC TGC AGC CCC GTG TGC AAG 363  
 Ser Trp His Thr Ser Asp Glu Cys Leu Tyr Cys Ser Pro Val Cys Lys  
 55 60 65

GAG CTG CAG TAC GTC AAG CAG GAG TGC AAT CGC ACC CAC AAC CGC GTG 411  
 Glu Leu Gln Tyr Val Lys Gln Glu Cys Asn Arg Thr His Asn Arg Val  
 70 75 80

TGC GAA TGC AAG GAA GGG CGC TAC CTT GAG ATA GAG TTC TGC TTG AAA 459  
 Cys Glu Cys Lys Glu Gly Arg Tyr Leu Glu Ile Glu Phe Cys Leu Lys  
 85 90 95

CAT AGG AGC TGC CCT CCT GGA TTT GGA GTG GTG CAA GCT G GTACGTGTCA 509  
 His Arg Ser Cys Pro Pro Gly Phe Gly Val Val Gln Ala  
 100 105 110

ATGTGCAGCA AAATTAATTA GGATCATGCA AAGTCAGATA GTTGTGACAG TTTAGGAGAA 569

CACTTTTGTT CTGATGACAT TATAGGATAG CAAATTGCAA AGGTAATGAA ACCTGCCAGG 629  
TAGGTACTAT GTGTCTGGAG TGCTTCCAAA GGACCATTGC TCAGAGGAAT ACTTTGCCAC 689  
TACAGGGCAA TTTAATGACA AATCTCAAAT GCAGCAAATT ATTCTCTCAT GAGATGCATG 749  
ATGGTTTTTT TTTTTTTTTT TAAAGAAACA AACTCAAGTT GCACTATTGA TAGTTGATCT 809  
ATACCTCTAT ATTTCACTTC AGCATGGACA CCTTCAAACCT GCAGCACTTT TTGACAAACA 869  
TCAGAAATGT TAATTTATAC CAAGAGAGTA ATTATGCTCA TATTAATGAG ACTCTGGAGT 929  
GCTAACAATA AGCAGTTATA ATTAATTATG TAAAAAATGA GAATGGTGAG GGAATTGCA 989  
TTTCATTATT AAAACAAGG CTAGTTCTTC CTTTAGCATG GGAGCTGAGT GTTTGGGAGG 1049  
GTAAGGACTA TAGCAGAATC TCTTCAATGA GCTTATTCTT TATCTTAGAC AAAACAGATT 1109  
GTCAAGCCAA GAGCAAGCAC TTGCCTATAA ACCAAGTGCT TTCTCTTTTG CATTTTGAAC 1169  
AGCATTGGTC AGGGCTCATG TGTATTGAAT CTTTTAAACC AGTAACCCAC GTTTTTTTTC 1229  
TGCCACATTT GCGAAGCTTC AGTGCAGCCT ATAACCTTTC ATAGCTTGAG AAAATTAAGA 1289  
GTATCCACTT ACTTAGATGG AAGAAGTAAT CAGTATAGAT TCTGATGACT CAGTTTGAAG 1349  
CAGTGTTTCT CAACTGAAGC CCTGCTGATA TTTTAAGAAA TATCTGGATT CCTAGGCTGG 1409  
ACTCCTTTTT GTGGGCAGCT GTCCTGCGCA TTGTAGAATT TTGGCAGCAC CCCTGGACTC 1469  
TAGCCACTAG ATACCAATAG CAGTCCTTCC CCCATGTGAC AGCCAAAAT GTCTTCAGAC 1529  
ACTGTCAAAT GTCGCCAGGT GGCAAATCA CTCCTGGTTG AGAACAGGGT CATCAATGCT 1589  
AAGTATCTGT AACTATTTTA ACTCTCAAAA CTTGTGATAT ACAAAGTCTA AATTATTAGA 1649  
CGACCAATAC TTTAGGTTTA AAGGCATACA AATGAAACAT TCAAAAATCA AAATCTATTC 1709  
TGTTTCTCAA ATAGTGAATC TTATAAAATT AATCACAGAA GATGCAAATT GCATCAGAGT 1769  
CCCTTAAAAT TCCTCTTCGT ATGAGTATTT GAGGGAGGAA TTGGTGATAG TTCCTACTTT 1829  
CTATTGGATG GTACTTTGAG ACTCAAAGC TAAGCTAAGT TGTGTGTGTG TCAGGGTGCG 1889  
GGGTGTGGAA TCCCATCAGA TAAAGCAAA TCCATGTAAT TCATTCAGTA AGTTGTATAT 1949  
GTAGAAAAAT GAAAAGTGGG CTATGCAGCT TGGAACTAG AGAATTTTGA AAAATAATGG 2009  
AAATCACAAG GATCTTTCTT AAATAAGTAA GAAAATCTGT TTGTAGAATG AAGCAAGCAG 2069  
GCAGCCAGAA GACTCAGAAC AAAAGTACAC ATTTTACTCT GTGTACACTG GCAGCACAGT 2129

GGGATTTATT TACCTCTCCC TCCCTAAAAA CCCACACAGC GGTTCCTCTT GGGAAATAAG 2189  
AGGTTTCCAG CCCAAAGAGA AGGAAAGACT ATGTGGTGTT ACTCTAAAAA GTATTTAATA 2249  
ACCGTTTTGT TGTGCTGTT GCTGTTTTGA AATCAGATTG TCTCCTCTCC ATATTTTATT 2309  
TACTTCATTC TGTTAATTCC TGTGGAATTA CTTAGAGCAA GCATGGTGAA TTCTCAACTG 2369  
TAAAGCCAAA TTTCTCCATC ATTATAATTT CACATTTTGC CTGGCAGGTT ATAATTTTTA 2429  
TATTTCCACT GATAGTAATA AGGTAAATC ATTACTTAGA TGGATAGATC TTTTTCATAA 2489  
AAAGTACCAT CAGTTATAGA GGAAGTCAT GTTCATGTTC AGGAAGGTCA TTAGATAAAG 2549  
CTTCTGAATA TATTATGAAA CATTAGTTCT GTCATTCTTA GATTCTTTTT GTTAAATAAC 2609  
TTTAAAAGCT AACTTACCTA AAAGAAATAT CTGACACATA TGAACCTCTC ATTAGGATGC 2669  
AGGAGAAGAC CCAAGCCACA GATATGTATC TGAAGAATGA ACAAGATTCT TAGGCCCGGC 2729  
ACGGTGGCTC ACATCTGTAA TCTCAAGAGT TTGAGAGGTC AAGGCGGGCA GATCACCTGA 2789  
GGTCAGGAGT TCAAGACCAG CCTGGCCAAC ATGATGAAAC CCTGCCTCTA CTAAAAATAC 2849  
AAAAATTAGC AGGGCATGGT GGTGCATGCC TGCAACCCTA GCTACTCAGG AGGCTGAGAC 2909  
AGGAGAATCT CTTGAACCCT CGAGGCGGAG GTTGTGGTGA GCTGAGATCC CTCTACTGCA 2969  
CTCCAGCCTG GGTGACAGAG ATGAGACTCC GTCCCTGCCG CCGCCCCCGC CTTCCCCCCC 3029  
AAAAAGATTC TTCTTCATGC AGAACATACG GCAGTCAACA AAGGGAGACC TGGGTCCAGG 3089  
TGTCOAAGTC ACTTATTTTC AGTAAATTAG CAATGAAAGA ATGCCATGGA ATCCCTGCCC 3149  
AAATACCTCT GCTTATGATA TTGTAGAATT TGATATAGAG TTGTATCCCA TTTAAGGAGT 3209  
AGGATGTAGT AGGAAAGTAC TAAAAACAAA CACACAAACA GAAAACCCTC TTTGCTTTGT 3269  
AAGGTGGTTC CTAAGATAAT GTCAGTGCAA TGCTGGAAAT AATATTTAAT ATGTGAAGGT 3329  
TTTAGGCTGT GTTTTCCCTT CCTGTTCTTT TTTTCTGCCA GCCCTTTGTC ATTTTTCAG 3389  
GTCAATGAAT CATGTAGAAA GAGACAGGAG ATGAAACTAG AACCAGTCCA TTTTGCCCCCT 3449  
TTTTTTATTT TCTGGTTTTG GTAAAAGATA CAATGAGGTA GGAGGTTGAG ATTTATAAAT 3509  
GAAGTTTAAT AAGTTTCTGT AGCTTTGATT TTTCTCTTTC ATATTTGTTA TCTTGCATAA 3569  
GCCAGAATTG GCCTGTAAAA TCTACATATG GATATTGAAG TCTAAATCTG TTCAACTAGC 3629  
TTACACTAGA TGGAGATATT TTCATATTCA GATACACTGG AATGTATGAT CTAGCCATGC 3689

2 0

GTAATATAGT CAAGTGTTTG AAGGTATTTA TTTTAAATAG CGTCTTTAGT TGTGGACTGG 3749  
 TTCAAGTTTT TCTGCCAATG ATTTCTTCAA ATTTATCAAA TATTTTCCA TCATGAAGTA 3809  
 AAATGCCCTT GCAGTCACCC TTCCTGAAGT TTGAACGACT CTGCTGTTTT AAACAGTTTA 3869  
 AGCAAATGGT ATATCATCTT CCGTTTACTA TGTAGCTTAA CTGCAGGCTT ACGCTTTTGA 3929  
 GTCAGCGGCC AACTTTATTG CCACCTTCAA AAGTTTATTA TAATGTTGTA AATTTTACT 3989  
 TCTCAAGGTT AGCATACTTA GGAGTTGCTT CACAATTAGG ATTCAGGAAA GAAAGAACTT 4049  
 CAGTAGGAAC TGATTGGAAT TTAATGATGC AGCATTCAAT GGGTACTAAT TTCAAAGAAT 4109  
 GATATTACAG CAGACACACA GCAGTTATCT TGATTTTCTA GGAATAATTG TATGAAGAAT 4169  
 ATGGCTGACA ACACGGCCTT ACTGCCACTC AGCGGAGGCT GGAATAATGA ACACCCTACC 4229  
 CTTCTTTCCT TTCCTCTCAC ATTTCTGAG CGTTTTGTAG GTAACGAGAA AATTGACTTG 4289  
 CATTTGCATT ACAAGGAGGA GAACTGGCA AAGGGGATGA TGGTGGAAGT TTTGTTCTGT 4349  
 CTAATGAAGT GAAAAATGAA AATGCTAGAG TTTTGTGCAA CATAATAGTA GCAGTAAAAA 4409  
 CCAAGTGAAA AGTCTTTCCA AAAGTGTGTT AAGAGGGCAT CTGCTGGGAA ACGATTTGAG 4469  
 GAGAAGGTAC TAAATTGCTT GGTATTTTCC GTAG GA ACC CCA GAG CGA AAT ACA 4523

Gly Thr Pro Glu Arg Asn Thr

115

GTT TGC AAA AGA TGT CCA GAT GGG TTC TTC TCA AAT GAG ACG TCA TCT 4571  
 Val Cys Lys Arg Cys Pro Asp Gly Phe Phe Ser Asn Glu Thr Ser Ser  
 120 125 130 135

AAA GCA CCC TGT AGA AAA CAC ACA AAT TGC AGT GTC TTT GGT CTC CTG 4619  
 Lys Ala Pro Cys Arg Lys His Thr Asn Cys Ser Val Phe Gly Leu Leu  
 140 145 150

CTA ACT CAG AAA GGA AAT GCA ACA CAC GAC AAC ATA TGT TCC GGA AAC 4667



2 1

Leu Thr Gln Lys Gly Asn Ala Thr His Asp Asn Ile Cys Ser Gly Asn

155

160

165

AGT GAA TCA ACT CAA AAA TGT GGA ATA G GTAATTACAT TCCAAAATAC 4715

Ser Glu Ser Thr Gln Lys Cys Gly Ile

170

175

GTCTTTGTAC GATTTTGTAG TATCATCTCT CTCTCTGAGT TGAACACAAG GCCTCCAGCC 4775  
ACATTCTTGG TCAAACCTTAC ATTTTCCCTT TCTTGAATCT TAACCAGCTA AGGCTACTCT 4835  
CGATGCATTA CTGCTAAAGC TACCACTCAG AATCTCTCAA AAACCTCATCT TCTCACAGAT 4895  
AACACCTCAA AGCTTGATTT TCTCTCCTTT CACACTGAAA TCAAATCTTG CCCATAGGCA 4955  
AAGGGCAGTG TCAAGTTTGC CACTGAGATG AAATTAGGAG AGTCCAAACT GTAGAATTCA 5015  
CGTTGTGTGT TATTACTTTC ACGAATGTCT GTATTATTAA CTAAAGTATA TATTGGCAAC 5075  
TAAGAAGCAA AGTGATATAA ACATGATGAC AAATTAGGCC AGGCATGGTG GCTTACTCCT 5135  
ATAATCCCAA CATTTTGGGG GGCCAAGGTA GGCAGATCAC TTGAGGTCAG GATTTCAGA 5195  
CCAGCCTGAC CAACATGGTG AAACCTTGTC TCTACTAAAA ATACAAAAT TAGCTGGGCA 5255  
TGGTAGCAGG CACTTCTAGT ACCAGCTACT CAGGGCTGAG GCAGGAGAAT CGCTTGAACC 5315  
CAGGAGATGG AGGTTGCAGT GAGCTGAGAT TGTACCACTG CACTCCAGTC TGGGCAACAG 5375  
AGCAAGATTT CATCACACAC ACACACACAC ACACACACAC ACACATTAGA AATGTGTACT 5435  
TGGCTTTGTT ACCTATGGTA TTAGTGATC TATTGCATGG AACTTCCAAG CTACTCTGGT 5495  
TGTGTTAAGC TCTTCATTGG GTACAGGTCA CTAGTATTAA GTTCAGGTTA TTCGGATGCA 5555  
TTCCACGGTA GTGATGACAA TTCATCAGGC TAGTGTGTGT GTTCACCTTG TCACTCCCAC 5615  
CACTAGACTA ATCTCAGACC TTCACTCAA GACACATTAC ACTAAAGATG ATTTGCTTTT 5675  
TTGTGTTTAA TCAAGCAATG GTATAAACCA GCTTGACTCT CCCCAAACAG TTTTTCGTAC 5735  
TACAAAGAAG TTTATGAAGC AGAGAAATGT GAATTGATAT ATATATGAGA TTCTAACCCA 5795  
GTTCCAGCAT TGTTTCATTG TGTAATTGAA ATCATAGACA AGCCATTTTA GCCTTTGCTT 5855

2 2

TCTTATCTAA AAAAAAAAAA AAAAAAATGA AGGAAGGGGT ATTAAAAGGA GTGATCAAAT 5915  
TTTAACATTC TCTTTAATTA ATTCATTTTT AATTTTACTT TTTTTCATTT ATTGTGCACT 5975  
TACTATGTGG TACTGTGCTA TAGAGGCTTT AACATTTATA AAAACACTGT GAAAGTTGCT 6035  
TCAGATGAAT ATAGGTAGTA GAACGGCAGA ACTAGTATTC AAAGCCAGGT CTGATGAATC 6095  
CAAAAACAAA CACCCATTAC TCCCATTTTC TGGGACATAC TTA CTCTACC CAGATGCTCT 6155  
GGGCTTTGTA ATGCCTATGT AAATAACATA GTTTTATGTT TGGTTATTTT CCTATGTAAT 6215  
GTCTACTTAT ATATCTGTAT CTATCTCTTG CTTTGTTTCC AAAGGTAAAC TATGTGTCTA 6275  
AATGTGGGCA AAAAATAACA CACTATTCCA AATTACTGTT CAAATTCCTT TAAGTCAGTG 6335  
ATAATTATTT GTTTGTGACAT TAATCATGAA GTTCCCTGTG GGTACTAGGT AAACCTTTAA 6395  
TAGAATGTTA ATGTTTGTAT TCATTATAAG AATTTTTGGC TGTTACTTAT TTACAACAAT 6455  
ATTTCACTCT AATTAGACAT TTA CTAACT TTCTCTTGAA AACAATGCCC AAAAAAGAAC 6515  
ATTAGAAGAC ACGTAAGCTC AGTTGGTCTC TGCCACTAAG ACCAGCCAAC AGAAGCTTGA 6575  
TTTTATTCAA ACTTTGCATT TTAGCATATT TTATCTTGGA AAATTCAATT GTGTTGGTTT 6635  
TTTGTTTTTG TTTGTATTGA ATAGACTCTC AGAAATCCAA TTGTTGAGTA AATCTTCTGG 6695  
GTTTTCTAAC CTTTCTTTAG AT GTT ACC CTG TGT GAG GAG GCA TTC TTC AGG 6747

Asp Val Thr Leu Cys Glu Glu Ala Phe Phe Arg

180

185

TTT GCT GTT CCT ACA AAG TTT ACG CCT AAC TGG CTT AGT GTC TTG GTA 6795  
Phe Ala Val Pro Thr Lys Phe Thr Pro Asn Trp Leu Ser Val Leu Val

190

195

200

GAC AAT TTG CCT GGC ACC AAA GTA AAC GCA GAG AGT GTA GAG AGG ATA 6843  
Asp Asn Leu Pro Gly Thr Lys Val Asn Ala Glu Ser Val Glu Arg Ile

205

210

215

AAA CGG CAA CAC AGC TCA CAA GAA CAG ACT TTC CAG CTG CTG AAG TTA 6891

Lys Arg Gln His Ser Ser Gln Glu Gln Thr Phe Gln Leu Leu Lys Leu

220

225

230

235

TGG AAA CAT CAA AAC AAA GAC CAA GAT ATA GTC AAG AAG ATC ATC CAA G 6940

Trp Lys His Gln Asn Lys Asp Gln Asp Ile Val Lys Lys Ile Ile Gln

240

245

250

GTATGATAAT CTAAAATAAA AAGATCAATC AGAAATCAAA GACACCTATT TATCATAAAC 7000  
CAGGAACAAG ACTGCATGTA TGTTTAGTTG TGTGGATCTT GTTTCCTGT TGGAAATCATT 7060  
GTTGGACTGA AAAAGTTTCC ACCTGATAAT GTAGATGTGA TTCCACAAAC AGTTATACAA 7120  
GGTTTTGTTC TCACCCCTGC TCCCAGTTT CTTGTAAAG TATGTTGAAC ACTCTAAGAG 7180  
AAGAGAAATG CATTTGAAGG CAGGGCTGTA TCTCAGGGAG TCGCTTCCAG ATCCCTTAAC 7240  
GCTTCTGTAA GCAGCCCCTC TAGACCACCA AGGAGAAGCT CTATAACCAC TTTGTATCTT 7300  
ACATTGCACC TCTACCAAGA AGCTCTGTTG TATTTACTTG GTAATTCTCT CCAGGTAGGC 7360  
TTTTCGTAGC TTACAAATAT GTTCTTATTA ATCCTCATGA TATGGCCTGC ATTAAAATTA 7420  
TTTAAATGGC ATATGTTATG AGAATTAATG AGATAAAATC TGAAAAGTGT TTGAGCCTCT 7480  
TGTAGGAAAA AGCTAGTTAC AGCAAAATGT TCTCACATCT TATAAGTTTA TATAAAGATT 7540  
CTCCTTTAGA AATGGTGTGA GAGAGAAACA GAGAGAGATA GGGAGAGAAG TGTGAAAGAA 7600  
TCTGAAGAAA AGGAGTTTCA TCCAGTGTGG ACTGTAAGCT TTACGACACA TGATGGAAAG 7660  
AGTTCTGACT TCAGTAAGCA TTGGGAGGAC ATGCTAGAAG AAAAAGGAAG AAGAGTTTCC 7720  
ATAATGCAGA CAGGGTCAGT GAGAAATTCA TTCAGGTCCT CACCAGTAGT TAAATGACTG 7780  
TATAGTCTTG CACTACCCTA AAAAATTCA AGTATCTGAA ACCGGGGCAA CAGATTTTAG 7840  
GAGACCAACG TCTTTGAGAG CTGATTGCTT TTGCTTATGC AAAGAGTAAA CTTTATGTT 7900  
TTGAGCAAAC CAAAAGTATT CTTTGAACGT ATAATTAGCC CTGAAGCCGA AAGAAAAGAG 7960  
AAAATCAGAG ACCGTTAGAA TTGGAAGCAA CCAAATCCC TATTTTATAA ATGAGGACAT 8020

2 4

TTTAACCCAG AAAGATGAAC CGATTTGGCT TAGGGCTCAC AGATACTAAG TGACTCATGT 8080  
CATTAAATAGA AATGTTAGTT CCTCCCTCTT AGGTTTGTAC CCTAGCTTAT TACTGAAATA 8140  
TTCTCTAGGC TGTGTGTCTC CTTTAGTTCC TCGACCTCAT GTCTTTGAGT TTTCAGATAT 8200  
CCTCCTCATG GAGGTAGTCC TCTGGTGCTA TGTGTATTCT TTAAAGGCTA GTTACGGCAA 8260  
TTAACTTATC AACTAGCGCC TACTAATGAA ACTTTGTATT ACAAAGTAGC TAACTTGAAT 8320  
ACTTTCCTTT TTTTCTGAAA TGTTATGGTG GTAATTTCTC AAACCTTTTC TTAGAAAAC 8380  
GAGAGTGATG TGTCTTATTT TCTACTGTTA ATTTTCAAAA TTAGGAGCTT CTTCCAAAGT 8440  
TTTGTTGGAT GCCAAAAATA TATAGCATAT TATCTTATTA TAACAAAAAA TATTTATCTC 8500  
AGTTCTTAGA AATAAATGGT GTCACTTAAC TCCCTCTCAA AAGAAAAGGT TATCATTGAA 8560  
ATATAATTAT GAAATTCTGC AAGAACCTTT TGCCTCACGC TTGTTTTATG ATGGCATTGG 8620  
ATGAATATAA ATGATGTGAA CACTTATCTG GGCTTTTGCT TTATGCAG AT ATT GAC 8676

Asp Ile Asp

CTC TGT GAA AAC AGC GTG CAG CGG CAC ATT GGA CAT GCT AAC CTC ACC 8724  
Leu Cys Glu Asn Ser Val Gln Arg His Ile Gly His Ala Asn Leu Thr  
255 260 265 270

TTC GAG CAG CTT CGT AGC TTG ATG GAA AGC TTA CCG GGA AAG AAA GTG 8772  
Phe Glu Gln Leu Arg Ser Leu Met Glu Ser Leu Pro Gly Lys Lys Val  
275 280 285

GGA GCA GAA GAC ATT GAA AAA ACA ATA AAG GCA TGC AAA CCC AGT GAC 8820  
Gly Ala Glu Asp Ile Glu Lys Thr Ile Lys Ala Cys Lys Pro Ser Asp  
290 295 300

CAG ATC CTG AAG CTG CTC AGT TTG TGG CGA ATA AAA AAT GGC GAC CAA 8868

2 5

Gln Ile Leu Lys Leu Leu Ser Leu Trp Arg Ile Lys Asn Gly Asp Gln  
 305 310 315

GAC ACC TTG AAG GGC CTA ATG CAC GCA CTA AAG CAC TCA AAG ACG TAC 8916  
 Asp Thr Leu Lys Gly Leu Met His Ala Leu Lys His Ser Lys Thr Tyr  
 320 325 330

CAC TTT CCC AAA ACT GTC ACT CAG AGT CTA AAG AAG ACC ATC AGG TTC 8964  
 His Phe Pro Lys Thr Val Thr Gln Ser Leu Lys Lys Thr Ile Arg Phe  
 335 340 345 350

CTT CAC AGC TTC ACA ATG TAC AAA TTG TAT CAG AAG TTA TTT TTA GAA 9012  
 Leu His Ser Phe Thr Met Tyr Lys Leu Tyr Gln Lys Leu Phe Leu Glu  
 355 360 365

ATG ATA GGT AAC CAG GTC CAA TCA GTA AAA ATA AGC TGC TTA 9054  
 Met Ile Gly Asn Gln Val Gln Ser Val Lys Ile Ser Cys Leu  
 370 375 380

TAAGTGGAAA TGGCCATTGA GCTGTTTCCT CACAATTGGC GAGATCCCAT GGATGAGTAA 9114  
 ACTGTTTCTC AGGCACTTGA GGCTTTCAGT GATATCTTTC TCATTACCAG TGAATAATTT 9174  
 TGCCACAGGG TACTAAAAGA AACTATGATG TGGAGAAAGG ACTAACATCT CCTCCAATAA 9234  
 ACCCCAAATG GTTAATCCAA CTGTCAGATC TGGATCGTTA TCTACTGACT ATATTTTCCC 9294  
 TTATTACTGC TTGCAGTAAT TCAACTGGAA ATTAAAAAAA AAAAAGTAGA CTCCACTGGG 9354  
 CCTTACTAAA TATGGGAATG TCTAACTTAA ATAGCTTTGG GATTCCAGCT ATGCTAGAGG 9414  
 CTTTATTAG AAAGCCATAT TTTTCTGT AAAAGTTACT AATATATCTG TAACACTATT 9474

2 6

ACAGTATTGC TATTTATATT CATTGAGATA TAAGATTTGG ACATATTATC ATCCTATAAA 9534  
 GAAACGGTAT GACTTAATTT TAGAAAGAAA ATTATATTCT GTTTATTATG ACAAATGAAA 9594  
 GAGAAAATAT ATATTTTAA TGGAAAGTTT GTAGCATTTT TCTAATAGGT ACTGCCATAT 9654  
 TTTTCTGTGT GGAGTATTTT TATAATTTTA TCTGTATAAG CTGTAATATC ATTTTATAGA 9714  
 AAATGCATTA TTTAGTCAAT TGTTTAATGT TGGAAAACAT ATGAAATATA AATTATCTGA 9774  
 ATATTAGATG CTCTGAGAAA TTGAATGTAC CTTATTTAAA AGATTTTATG GTTTTATAAC 9834  
 TATATAAATG ACATTATTAA AGTTTTCAAA TTATTTTAA TTGCTTTCTC TGTGCTTTT 9894  
 ATTT 9898

配列番号 : 3

配列の長さ : 4 0 1

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 1

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 蛋白質

配列 :

Met	Asn	Asn	Leu	Leu	Cys	Cys	Ala	Leu	Val	Phe	Leu	Asp	Ile	Ser
-20					-15					-10				
Ile	Lys	Trp	Thr	Thr	Gln	Glu	Thr	Phe	Pro	Pro	Lys	Tyr	Leu	His
-5					1					5				
Tyr	Asp	Glu	Glu	Thr	Ser	His	Gln	Leu	Leu	Cys	Asp	Lys	Cys	Pro
10					15					20				
Pro	Gly	Thr	Tyr	Leu	Lys	Gln	His	Cys	Thr	Ala	Lys	Trp	Lys	Thr
25					30					35				
Val	Cys	Ala	Pro	Cys	Pro	Asp	His	Tyr	Tyr	Thr	Asp	Ser	Trp	His
40					45					50				

Thr Ser Asp Glu Cys Leu Tyr Cys Ser Pro Val Cys Lys Glu Leu		
55	60	65
Gln Tyr Val Lys Gln Glu Cys Asn Arg Thr His Asn Arg Val Cys		
70	75	80
Glu Cys Lys Glu Gly Arg Tyr Leu Glu Ile Glu Phe Cys Leu Lys		
85	90	95
His Arg Ser Cys Pro Pro Gly Phe Gly Val Val Gln Ala Gly Thr		
100	105	110
Pro Glu Arg Asn Thr Val Cys Lys Arg Cys Pro Asp Gly Phe Phe		
115	120	125
Ser Asn Glu Thr Ser Ser Lys Ala Pro Cys Arg Lys His Thr Asn		
130	135	140
Cys Ser Val Phe Gly Leu Leu Leu Thr Gln Lys Gly Asn Ala Thr		
145	150	155
His Asp Asn Ile Cys Ser Gly Asn Ser Glu Ser Thr Gln Lys Cys		
160	165	170
Gly Ile Asp Val Thr Leu Cys Glu Glu Ala Phe Phe Arg Phe Ala		
175	180	185
Val Pro Thr Lys Phe Thr Pro Asn Trp Leu Ser Val Leu Val Asp		
190	195	200
Asn Leu Pro Gly Thr Lys Val Asn Ala Glu Ser Val Glu Arg Ile		
205	210	215
Lys Arg Gln His Ser Ser Gln Glu Gln Thr Phe Gln Leu Leu Lys		
220	225	230
Leu Trp Lys His Gln Asn Lys Asp Gln Asp Ile Val Lys Lys Ile		
235	240	245

2 8

Ile Gln Asp Ile Asp Leu Cys Glu Asn Ser Val Gln Arg His Ile		
250	255	260
Gly His Ala Asn Leu Thr Phe Glu Gln Leu Arg Ser Leu Met Glu		
265	270	275
Ser Leu Pro Gly Lys Lys Val Gly Ala Glu Asp Ile Glu Lys Thr		
280	285	290
Ile Lys Ala Cys Lys Pro Ser Asp Gln Ile Leu Lys Leu Leu Ser		
295	300	305
Leu Trp Arg Ile Lys Asn Gly Asp Gln Asp Thr Leu Lys Gly Leu		
310	315	320
Met His Ala Leu Lys His Ser Lys Thr Tyr His Phe Pro Lys Thr		
325	330	335
Val Thr Gln Ser Leu Lys Lys Thr Ile Arg Phe Leu His Ser Phe		
340	345	350
Thr Met Tyr Lys Leu Tyr Gln Lys Leu Phe Leu Glu Met Ile Gly		
355	360	365
Asn Gln Val Gln Ser Val Lys Ile Ser Cys Leu		
370	375	380

配列番号 : 4

配列の長さ : 1 2 0 6

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA

配列 :



ATGAACAACT TGCTGTGCTG CGCGCTCGTG TTTCTGGACA TCTCCATTAA GTGGACCACC 60  
CAGGAAACGT TTCCTCCAAA GTACCTTCAT TATGACGAAG AAACCTCTCA TCAGCTGTTG 120  
TGTGACAAAT GTCCTCCTGG TACCTACCTA AAACAACACT GTACAGCAAA GTGGAAGACC 180  
GTGTGCGCCC CTTGCCCTGA CCACTACTAC ACAGACAGCT GGCACACCAG TGACGAGTGT 240  
CTATACTGCA GCCCCGTGTG CAAGGAGCTG CAGTACGTCA AGCAGGAGTG CAATCGCACC 300  
CACAACCGCG TGTGCGAATG CAAGGAAGGG CGCTACCTTG AGATAGAGTT CTGCTTGAAA 360  
CATAGGAGCT GCCCTCCTGG ATTTGGAGTG GTGCAAGCTG GAACCCCAAG GCGAAATACA 420  
GTTTGCAAAA GATGTCCAGA TGGGTTCTTC TCAAATGAGA CGTCATCTAA AGCACCTGT 480  
AGAAAACACA CAAATTGCAG TGTCTTTGGT CTCCTGCTAA CTCAGAAAGG AAATGCAACA 540  
CACGACAACA TATGTTCCGG AAACAGTGAA TCAACTCAA AATGTGGAAT AGATGTTACC 600  
CTGTGTGAGG AGGCATTCTT CAGGTTTGCT GTTCCTACAA AGTTTACGCC TAACTGGCTT 660  
AGTGTCTTGG TAGACAATTT GCCTGGCACC AAAGTAAACG CAGAGAGTGT AGAGAGGATA 720  
AAACGGCAAC ACAGCTCACA AGAACAGACT TTCCAGCTGC TGAAGTTATG GAAACATCAA 780  
AACAAAGACC AAGATATAGT CAAGAAGATC ATCCAAGATA TTGACCTCTG TGAAAACAGC 840  
GTGCAGCGGC ACATTGGACA TGCTAACCTC ACCTTCGAGC AGCTTCGTAG CTTGATGGAA 900  
AGCTTACCGG GAAAGAAAGT GGGAGCAGAA GACATTGAAA AAACAATAAA GGCATGCAAA 960  
CCCAGTGACC AGATCCTGAA GCTGCTCAGT TTGTGGCGAA TAAAAAATGG CGACCAAGAC 1020  
ACCTTGAAGG GCCTAATGCA CGCACTAAAG CACTCAAAGA CGTACCACTT TCCCAAACT 1080  
GTCACTCAGA GTCTAAAGAA GACCATCAGG TTCCTTCACA GCTTCACAAT GTACAAATTG 1140  
TATCAGAAGT TATTTTLAGA AATGATAGGT AACCAGGTCC AATCAGTAAA AATAAGCTGC 1200  
TTATAA 1206

## 請 求 の 範 囲

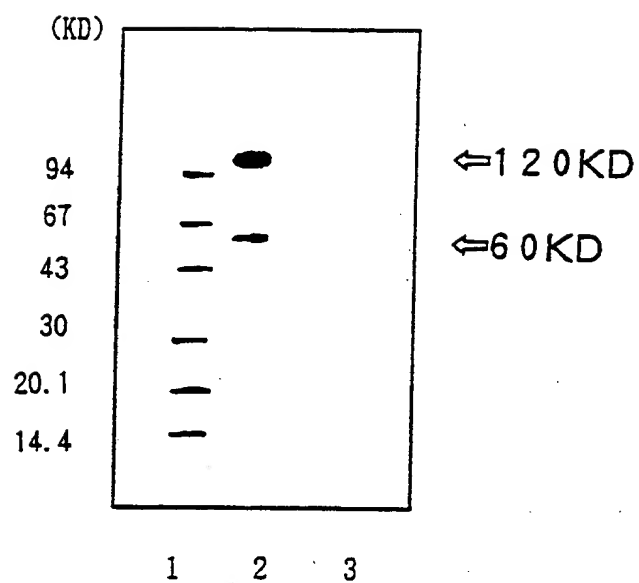
1. 配列表配列番号 1 及び 2 の塩基配列を含む DNA。
2. 配列番号 1 には OCIF 遺伝子の第 1 エクソンが含まれ、配列番号 2 には第 2、第 3、第 4、第 5 エクソンが含まれ、且つ、第 1 エクソンと第 2 エクソンの間におよそ 17kb のヌクレオチドが介在する、クレーム 1 に記載の DNA。
3. 次の物理化学的性質をもち、破骨細胞の分化及び／又は成熟抑制活性のある蛋白質。
  - (a) 分子量 (SDS-PAGE による);
    - (i) 還元条件下で約 60kD
    - (ii) 非還元条件下で約 60kD 及び約 120kD
  - (b) アミノ酸配列;  
配列表配列番号 3 のアミノ酸配列を有する。
  - (c) 親和性;  
陽イオン交換体及びヘパリンに親和性を有する。
  - (d) 熱安定性;
    - (i) 70°C、10 分間または 56°C、30 分間の加熱処理により破骨細胞の分化・成熟抑制活性が低下する。
    - (ii) 90°C、10 分間の加熱処理により破骨細胞の分化・成熟抑制活性が失われる。
4. 配列表配列番号 1 及び 2 の塩基配列を含む DNA を発現ベクターに挿入して次の物理化学的性質をもち、破骨細胞の分化及び／又は成熟抑制活性のある蛋白質を発現することのできるベクターを作成し、これを用いて遺伝子工学的手法により該蛋白質を製造することを特徴とする破骨細胞の分化及び／又は成熟抑制活性のある蛋白質の製造法。
  - (a) 分子量 (SDS-PAGE による);

- (i) 還元条件下で約60kD
- (ii) 非還元条件下で約60kD及び約120kD
- (b) アミノ酸配列;  
配列表配列番号3のアミノ酸配列を有する。
- (c) 親和性;  
陽イオン交換体及びヘパリンに親和性を有する。
- (d) 熱安定性;
  - (i) 70℃、10分間または56℃、30分間の加熱処理により破骨細胞の分化・成熟抑制活性が低下する。
  - (ii) 90℃、10分間の加熱処理により破骨細胞の分化・成熟抑制活性が失われる。

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

1 / 1

第 1 図



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/02859

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. C1<sup>6</sup> C12N15/00, C12P21/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. C1<sup>6</sup> C12N15/00, C12P21/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI, GENETYX-CDROM, BIOSIS

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Cancer Research, (1995), Vol. 55, Toshiyuki Yoneda, et al. "Sumarin suppresses hypercalcemia and osteoclastic bone resorption in nude mice bearing a human squamous cancer" P. 1989-1993	1 - 4
A	Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1990) Vol. 87 Kukita A. et al. "Osteoinductive factor inhibits formation of human osteoclast-like cells" P. 3023-3026	1 - 4

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

## \* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
September 29, 1997 (29. 09. 97)Date of mailing of the international search report  
October 7, 1997 (07. 10. 97)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



国際出願番号 PCT/JP97/02859

国際調査報告

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. cl<sup>8</sup> C12N15/00, C12P21/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. cl<sup>8</sup> C12N15/00, C12P21/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI, GENETYX-CDROM, BIOSIS

C. 関連すると認められる文献

引用文献の  
カテゴリー\*

引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示

関連する  
請求の範囲の番号

A

Cancer Research, (1995), VOL. 55, Toshiyuki Yoneda, et al [Sumarin suppresses hypercalcemia and osteoclastic bone resorption in nude mice bearing a human squamous cancer] P.1989-1993

1-4

A

Proc. Natl. Acad. Sci. USA. (1990) VOL. 87 Kukita A. et al [Osteoinductive factor inhibits formation of human osteoclast-like cells] P.3023-3026

1-4

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

\* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

「T」日の後に公表された文献  
国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日  
29.09.97

国際調査報告の発送日

07.10.97

国際調査機関の名称及びあて先  
日本国特許庁 (ISA/J P)  
郵便番号100  
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)  
藤田 節

電話番号 03-3581-1101 内線 3449

様式PCT/ISA/210 (第2ページ) (1992年7月)

THIS PAGE BLANK (USPTO)